Journal of Horticultural Science
https://jhs.um.ac.ir

Research Article
Vol. 38, No. 4, Winter 2024, p. 745-762

# Investigating the Effect of Different Concentrations of Murashige and Skoog (MS) Medium and Sucrose on the Production of Potato (*Solanum tuberosum* L.) Microtubers *In Vitro*

**F. Yarmohammadi[1], A. Motallebi-Azar[2], S. Kazemiani[3], M. Amani[4*]**

1- M.Sc. Graduate, Bastam Agricultural Jihad Center, Semnan Province, Shahrood, Iran
2, 3 and 4- Associate Professor, M.Sc. Graduate and Ph.D. Student, Department of Horticultural Sciences, Faculty of Agriculture, University of Tabriz, Tabriz, Iran, respectively
(*- Corresponding author's Email: Mina76amani@yahoo.com)

| | |
|---|---|
| Received: 06-03-2024<br>Revised: 08-07-2024<br>Accepted: 18-07-2024<br>Available Online: 18-07-2024 | **How to cite this article:**<br>Yarmohammadi, F., Motallebi-Azar, A., Kazemiani, S., & Amani M. (2024). Investigating the effect of different concentrations of Murashige and Skoog (MS) medium and sucrose on the production of potato (*Solanum tuberosum* L.) microtubers *in vitro*. *Journal of Horticultural Science, 38*(4), 745-762. (In Persian with English abstract). https://doi.org/10.22067/jhs.2024.87157.1330 |

**Introduction**

Considering the sensitivity of potatoes (*Solanum tuberosum* L.) to viruses, the production of virus-free plants through in vitro cultivation and their propagation leads to a reduction in costs and an increase in yield. One of the effective methods of reducing plant diseases and producing disease-free microtubers is the use of in-vitro production methods. Considering the role and importance of macro elements and micro elements in the growth of microtubers, it is possible to change the composition of MS culture medium by changing the concentration of salts of macro elements and micro elements without disturbing the balance of elements. This experiment aims to investigate the effect of different concentrations of macro elements (2 Mac, Mac, ½ Mac) and micro elements (2 Mic, Mic, ½ Mic) of MS culture medium in combination with two concentrations of sucrose (80 and 160 g.l$^{-1}$) was performed on in vitro micronodulation of Agria potato.

**Materials and Methods**

This experiment aimed to investigate the effects of different concentrations of macroelements (2 Mac, Mac, ½ Mac) and microelements (2 Mic, Mic, ½ Mic) in the MS culture medium, combined with two sucrose concentrations (80 and 160 g.l$^{-1}$), on in vitro microtuberization of Agria potato. The study was conducted as a factorial experiment in a completely randomized design with three replications in the plant tissue culture laboratory of the Department of Horticultural Sciences at the Faculty of Agriculture, University of Tabriz. Lateral buds obtained from in-vitro shoots were used as explants and were cultured under sterile conditions on different culture mediums for the purpose of microtuberation, and the cultures were kept in continuous darkness and at a temperature of 18±2°C were kept in the growth room. During one month, Microtuber initiation rate and after two months, microtuber formation characteristics were measured.

**Results and Discussion**

The results of the analysis of variance showed that the effect of the concentration of micro elements and the interaction effects of micro elements with different concentrations of sucrose and macro elements were significant only in the case of two traits, the percentage and the speed of microtuber initiation, while all microtuber traits productivity was significantly affected by the interaction of micro elements and macro elements. In all culture mediums with 8% sucrose, the initiation percentage of microtubers was 100% and the initiation rate was also maximum. However, the highest percentage of microtuber formation, weight, length, diameter and number of buds on microtuber was obtained in 2Mac culture medium with 16% sucrose. The results showed that the microtuber that


https://doi.org/10.22067/jhs.2024.87157.1330

had more weight and size had a higher percentage of dormancy and the buds on the microtuber were not able to germinate and produce microtuber during the stages of microtuber formation.

## Conclusion

For all traits related to microtubers, except for the percentage and speed of microtuber initiation, the effects of microelements, macroelements, and sucrose were not significant. This indicates that the three factors investigated do not independently enhance microtuber formation in the Agria variety. Regarding micronodulation traits, the interaction effect of low-consumption elements with the other two factors was also not significant, suggesting that the concentration of low-consumption elements is not critical for micronodulation in the Agria variety. In all culture media with 8% sucrose, the initiation percentage of microtubers reached 100%, and the initiation speed was at its maximum. However, when the concentration of macroelements was doubled and 16% sucrose was used, both the initiation percentage and speed of microgland formation in the Agria variety showed a significant decrease. The percentage of microtuber formation, weight, length, diameter and number of buds on the microtuber in Agria cultivar were significantly affected by the mutual effect of the concentration of macro elements and sucrose, and the 2 Mac culture medium has 16% sucrose in the first priority and the ½ culture medium Mac with 8 % sucrose in the second priority was better than the other treatments in terms of the investigated traits. In this research, it was found that the produced microglands with greater weight and size had a higher percentage of dormancy and during the stages of microglandogenesis, the buds on the microtubers were not able to germinate and produce microtubers.

**Keywords:** Agria variety, Macro elements, Micro elements, Microtuber formation, Tissue culture

نشریه علوم باغبانی
https://jhs.um.ac.ir

مقاله پژوهشی
جلد ۳۸، شماره ۴، زمستان ۱۴۰۳، ص. ۷۶۲-۷۴۵

# بررسی اثر غلظت‌های مختلف محیط‌کشت موراشیک و اسکوگ (MS) و ساکارز در تولید ریزغده سیب‌زمینی (*Solanum tuberosum* L.) در شرایط درون شیشه‌ای

فهیمه یارمحمدی[1]- علیرضا مطلبی‌آذر[2]- سمانه کاظمیانی[3]- مینا امانی[4]*

تاریخ دریافت: ۱۴۰۲/۱۲/۱۶
تاریخ پذیرش: ۱۴۰۳/۰۴/۲۸

## چکیده

هدف از این پژوهش، بررسی افزایش سرعت ریزغده‌زایی و بهبود صفات ریزغده‌زایی، تعیین بهترین غلظت ساکارز (۸۰ و ۱۶۰ گرم در لیتر)، نمک‌های عناصر پرمصرف (2 Mac, Mac, ½ Mac) و کم‌مصرف (2Mic, Mic, ½ Mic) و غلظت‌های مختلف محیط کشت MS برای بهبود سرعت و کمیت ریزغده‌زایی در سیب‌زمینی (*Solanum tuberosum* L.) رقم آگریا اجرا شد. از جوانه‌های جانبی حاصل از شاخساره‌های درون شیشه‌ای به‌عنوان ریزنمونه استفاده شد و تحت شرایط استریل روی محیط‌های کشت مختلف به‌منظور ریزغده‌زایی کشت شدند و کشت‌ها در تاریکی مداوم و دمای ۲±۱۸ درجه سانتی‌گراد در اتاق رشد نگهداری شدند. در طی یک ماه سرعت آغازش ریزغده و پس از گذشت دو ماه صفات ریزغده‌زایی اندازه‌گیری شد. نتایج تجزیه واریانس نشان داد که اثر غلظت عناصر کم‌مصرف و اثرات متقابل عناصر کم‌مصرف با غلظت‌های مختلف ساکارز و عناصر پرمصرف فقط در مورد دو صفت درصد و سرعت آغازش ریزغده معنی‌دار بوده، درحالی‌که تمامی صفات ریزغده‌زایی از اثر متقابل عناصر کم‌مصرف × پرمصرف به‌طور معنی‌داری متأثر شدند. در تمامی محیط‌های کشت دارای ۸۰ گرم در لیتر ساکارز، درصد آغازش ریزغده‌ها ۱۰۰ درصد و سرعت آغازش نیز حداکثر بود. بااین‌حال، بالاترین درصد تشکیل ریزغده، وزن، طول، قطر و تعداد جوانه روی ریزغده، در محیط‌کشت 2Mac دارای ۱۶۰ گرم در لیتر ساکارز به‌دست آمد. نتایج نشان داد که ریزغده‌هایی که وزن و اندازه بیشتری داشتند، از درصد رکود بیشتری برخوردار بودند و جوانه‌های روی ریزغده‌ها طی مراحل ریزغده‌زایی، قادر به جوانه‌زنی و تولید ریزغده نبودند. در همه محیط‌های کشت استفاده شده همراه با ۸۰ گرم در لیتر ساکارز، درصد آغازش ریزغده‌ها ۱۰۰ درصد و سرعت آغازش غده بیشتر بود، ولی زمانی‌که از دوبرابر غلظت عناصر پرمصرف و ۱۶۰ گرم در لیتر ساکارز استفاده شد، درصد آغازش و سرعت آغازش ریزغده کاهش یافت. در این تحقیق مشخص شد که ریزغده‌های تولیدی با وزن و اندازه بیشتر، از درصد رکود بیشتری برخوردار بودند و طی مراحل ریزغده‌زایی، جوانه‌های روی ریزغده‌ها قادر به جوانه‌زنی و تولید ریزغده نبودند.

**واژه‌های کلیدی:** رقم آگریا، ریزغده‌زایی، عناصر پرمصرف، عناصر کم‌مصرف، کشت‌بافت

## مقدمه

با توجه به افزایش روزافزون جمعیت جهان در سال‌های اخیر، نیاز به مواد غذایی اهمیت زیادی پیدا کرده است. یکی از راه‌های افزایش مواد غذایی، افزایش تولیدات کشاورزی است. سیب‌زمینی با نام علمی (*Solanum tuberosum* L.) یکی از گیاهان تیره Solanaceae به‌دلیل کشت‌وکار آسان به‌عنوان اولین سبزی رایج در جهان کشت می‌شود (Abelenda *et al.*, 2019). میزان استفاده از سیب‌زمینی (*Solanum tuberosum* L.) به‌عنوان غذا در جهان ۳۰ الی ۷۲ درصد می‌باشد (Shahriyar *et al.*, 2015)، اولاً به‌عنوان یک منبع کربوهیدرات و ثانیاً به‌عنوان سبزی استفاده می‌شود، بنابراین سیب‌زمینی از مهم‌ترین سبزیجات در جهان به‌شمار می‌آید. ازآنجاکه ازدیاد سیب‌زمینی توسط اندام‌های غیرجنسی (غده‌ها) صورت می‌گیرد، دسترسی به گیاهان و غده‌های سالم و مناسب حائز اهمیت است

۱- دانش آموخته کارشناسی ارشد، مرکز جهاد کشاورزی بسطام، استان سمنان، شاهرود، ایران
۲، ۳ و ۴- به‌ترتیب دانشیار، دانش آموخته کارشناسی ارشد و دانشجوی دکتری، گروه علوم باغبانی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه تبریز، تبریز، ایران
(*- نویسنده مسئول: Email: Mina76amani@yahoo.com)

https://doi.org/10.22067/jhs.2024.87157.1330

(Salem & Hassanein, 2017). باتوجه‌به حساسیت سیب‌زمینی به ویروس‌ها، تولید گیاهان عاری از ویروس از طریق کشت درون شیشه‌ای و تکثیر آن‌ها، به کاهش هزینه‌ها و افزایش عملکرد منجر می‌شود (Hannapel, 2007; Igbal *et al.*, 2016). تولید ریزغده در شرایط درون شیشه‌ای اولین بار توسط کشت گره‌های منفرد با جوانه‌های جانبی برای تولید غده بذری عاری از ویروس در سیب‌زمینی صورت گرفت (Haque *et al.*, 2009). این ریزغده‌های عاری از بیماری را می‌توان در تمام طول سال و در هر حجمی تولید کرد (Hannapel, 2007).

عامل‌های مؤثر بر ریزغده‌زایی در شرایط درون شیشه‌ای شامل ژنوتیپ (Ahloowalia, 1999)، نوع ریزنمونه (Khuri & Moorby, 1996)، فتوپریود (Hussey & Stacey, 1984)، دما (Akita & Takayama, 1994)، نوع منبع کربن (Garner & Blake, 1989)، تنظیم‌کننده‌های رشد (Ortiz-Montiel & Lozoya-Saldafia, 1987) و ترکیبات محیط‌کشت است. غده سیب‌زمینی از نظر گیاهشناسی، ساقه تغییرشکل یافته است. جوانه‌های جانبی در شرایط درون‌شیشه‌ای به محرک‌های خارجی به‌منظور توسعه شاخساره یا ریزغده‌زایی پاسخ می‌دهند (Afrasiab & Iqbal, 2012). تأمین محیط‌کشت مناسب برای ادامه رشد ریزغده‌ها ضروری است و به‌نظر می‌رسد که مؤثرترین راه برای رسیدن به ریزغده‌های بزرگ‌تر باشد (Khalafalla *et al.*, 2010). امروزه در دنیا و در کشور ایران، تحقیقات زیادی در ارتباط با ریززادیادی گیاهانی با ارزش اقتصادی صورت گرفته است (Joshi & Mature, 2015) که در این میان، پژوهش‌هایی نیز بر روند ریزغده‌زایی سیب‌زمینی جهت بهبود کیفیت آن صورت گرفته است (Motallebi-Azar *et al.*, 2011; 2013; Khalil *et al.*, 2017; Ashrafzadeh & Leung, 2015; Ebadi & Iranbakhsh, 2011; Snnowald & Snnowald, 2015). در تمامی مطالعات، از محیط کشت پایه MS استفاده شده است و تغییری در ترکیبات اصلی این محیط کشت (عناصر پرمصرف و کم‌مصرف) انجام نشده است و با توجه به نقش و اهمیت عناصر پرمصرف و کم‌مصرف در رشد ریزغده‌ها، می‌توان با تغییر غلظت نمک‌های عناصر پرمصرف و کم‌مصرف، بدون برهم‌زدن تعادل عناصر، در ترکیب محیط‌کشت MS تغییراتی را ایجاد نمود و اثر آن‌ها را روی ریزغده‌زایی بررسی کرد (Yu *et al.*, 2000). در شرایط درون‌شیشه‌ای، اضافه کردن ساکارز در سطوح بالا به محیط کشت الزامی است تا ریزغده‌زایی صورت بگیرد (Simko, 1994). یو و همکاران (Yu *et al.*, 2000) ساکارز را به‌عنوان منبع کربنی معرفی کردند که برای رشد ریزغده‌ها تقدم بیشتری نسبت به فراورده‌های حاصل از هیدرولیز آن دارد و مقدار ساکارز در دسترس را از عوامل اصلی در تولید ریزغده‌ها دانستند (George, 1993; Karhu, 1997). ساکارز دارای دو نوع نقش در توسعه ریزغده‌ها می‌باشد. نقش اول آن به‌عنوان منبع کربن است که به‌آسانی توسط گیاهچه‌های درون‌شیشه‌ای جذب و به نشاسته تبدیل می‌شود. نقش دوم آن در رشدونمو ریزغده است (Yu *et al.*, 2000). هیدرولیز ساکارز منجر به تولید مقادیر برابر گلوکز و فروکتوز می‌شود. در محیط‌کشت، غلظت گلوکز همیشه کمتر از غلظت فروکتوز است، زیرا سلول‌های سیب‌زمینی تمایل بیشتری برای جذب گلوکز از فروکتوز دارند (Yu *et al.*, 2000). برای رسیدن به اندازه معمول ریزغده، نگهداری غلظت ساکارز در سطح مناسب در طول رشدونمو ریزغده ضروری است (Yu *et al.*, 2000).

برای انجام یک آزمایش موفق و یا تولید و تکثیر گیاه از طریق کشت بافت و ایجاد اندام‌های هوایی نابجا در ریزنمونه‌های کشت شده، ترکیبات محیط کشت نقش اساسی و سرنوشت‌ساز دارد. محیط کشت غذایی، عامل مهم در کشت بافت و سلول به‌شمار می‌رود، آنچه که طراحی محیط کشت را به‌طور خاصی مشکل می‌کند، اثرات متقابل بسیار پیچیده مواد شیمیایی مختلف در یک محیط کشت غذایی مشخص می‌باشد. به‌عنوان مثال، کاربرد بعضی از قندها در محیط کشت سبب کمبود بر می‌شود (George, 1993; Karhu, 1997). همچنین محیط‌های کشت از نظر پتانسیل اسمزی متفاوت می‌باشند. پتانسیل اسمزی محیط‌های کشت مختلف به‌وسیله مواد قابل حل اندازه‌گیری می‌شود که ساکارز و عناصر پرمصرف، بیشترین تأثیر را در پتانسیل اسمزی محیط کشت دارند (George, 1993). این تحقیق به‌منظور افزایش سرعت ریزغده‌زایی و بهبود صفات ریزغده‌زایی، تعیین بهترین غلظت ساکارز، نمک‌های عناصر پرمصرف و کم‌مصرف و غلظت‌های مختلف محیط کشت MS برای بهبود سرعت و کمیت ریزغده‌زایی در رقم آگریا اجرا شد.

## مواد و روش‌ها

این آزمایش، در آزمایشگاه کشت بافت گیاهی گروه علوم باغبانی دانشکده کشاورزی دانشگاه تبریز انجام شده است. در این بررسی از گیاهچه‌های درون شیشه‌ای عاری از ویروس سیب‌زمینی رقم آگریا موجود در آزمایشگاه کشت بافت گیاهی گروه علوم باغبانی دانشگاه تبریز استفاده شد. برای تهیه محیط‌کشت، اقدام به تهیه محلول‌های پایه از نمک‌های معدنی و ویتامین‌ها گردید. مواد لازم و مقادیر آن‌ها برای تهیه یک لیتر از محیط‌کشت MS ½، MS و 2MS در جدول ۱ آورده شده است. برای تهیه محیط‌کشت، مواد لازم به‌صورت هفت محلول ذخیره (استوک) شامل نمک‌های عناصر پرمصرف، نمک‌های عناصر کم‌مصرف، KI و $CaCl_2$، نمک آهن، نمک مس و مولیبدن و ویتامین‌ها تهیه و در یخچال نگهداری گردید. برای تهیه محیط‌کشت، مقدار لازم از محلول‌های ذخیره برداشته و همراه با ترکیب عناصر پرمصرف و کم‌مصرف موردنیاز (که به‌صورت ذخیره تهیه شده بود)، به محیط‌کشت اضافه شد. حجم محلول به ۱۰۰۰ میلی‌لیتر رسانده شد و

بسته به نوع تیمار ساکارز محیط‌کشت، ۸۰ یا ۱۶۰ گرم در لیتر ساکارز به محیط‌کشت اضافه شد. بعد از افزودن مقدار ۰/۱ گرم بر لیتر میواینوزیتول، pH محلول با استفاده از NaOH یا HCl یک نرمال روی ۵/۸ تنظیم گردید. برای جلوگیری از تغییر در pH محیط‌کشت در مدت زمان رشد ریزنمونه‌ها، از MES[1] به‌مقدار ۰/۵ میلی‌گرم در لیتر استفاده شد. برای تهیه محیط جامد، هشت گرم آگار به محیط اضافه شد. پس از حل شدن کامل آگار، در داخل هر ظرف شیشه‌ای، ۳۰ میلی‌لیتر محیط کشت با استفاده از استوانه مدرج ریخته شد و محیط‌های کشت اتوکلاو در دمای ۱۲۱ درجه سانتی‌گراد و فشار یک اتسمفر به‌مدت ۲۰ دقیقه شدند. پس از ضدعفونی، محیط‌های کشت تا زمان کشت در شرایط تاریکی نگهداری شدند.

### محیط کشت ریزغده‌زایی

برای بررسی ریزغده‌زایی از محیط‌های کشت ½ Mac، Mac و 2 Mac، ½ Mic، Mic و 2 Mic همراه با دو غلظت ۸۰ و ۱۶۰ گرم ساکارز در لیتر، جمعاً ۱۸ ترکیب استفاده شد (جدول ۲).

جدول ۱- مواد و مقادیر آن‌ها برای تهیه یک لیتر محیط‌کشت

**Table 1- Materials and their amounts for preparing one liter of medium**

| محلول ذخیره (استوک) Stock solution | مواد Material | مقادیر اصلی برای تهیه محیط‌کشت 2MS The main values for the preparation of 2MS culture medium (g.l$^{-1}$) | مقادیر اصلی برای تهیه محیط‌کشت MS Main values for preparation of MS culture medium (g.l$^{-1}$) | مقادیر اصلی برای تهیه محیط‌کشت ½ MS The main values for the preparation of culture medium ½ MS (g.l$^{-1}$) |
|---|---|---|---|---|
| نمک‌های عناصر ماکرو Macro elements | $NH_4NO_3$ | 3.3 | 1.65 | 0.825 |
| | $KNO_3$ | 3.8 | 1.9 | 0.95 |
| | $MgSO_4.7H_2O$ | 0.74 | 0.37 | 0.185 |
| | $KH_2PO4$ | 0.34 | 0.17 | 0.085 |
| نمک‌های عناصر میکرو Micro elements | $MnSO_4.4H2O$ | 0.046 | 0.023 | 0.0115 |
| | $ZnSO_4.7H_2O$ | 0.0172 | 0.0086 | 0.0043 |
| | $H_3BO_3$ | 0.0124 | 0.0062 | 0.0031 |
| | $Na_2MoO_4.2H_2O$ | 0.0005 | 0.00025 | 0.000125 |
| | $CuSO_4.5H_2O$ | 0.00005 | 0.000025 | 0.0000125 |
| | $CoCl_2.6H_2O$ | 0.00005 | 0.000025 | 0.0000125 |
| کلسیم Calcium | $CaCl_2.2H_2O$ | 0.88 | 0.44 | 0.22 |
| ید Iodine | KI | 0.00166 | 0.00083 | 0.000415 |
| ویتامین Vitamin | Nicotinic acid | 0.0005 | 0.0005 | 0.0005 |
| | Thiamin.HCl | 0.0005 | 0.0005 | 0.0005 |
| | Pyridoxine.HCl | 0.0001 | 0.0001 | 0.0001 |
| | Glycine | 0.002 | 0.002 | 0.002 |
| آهن Iron | $FeSO_4. 7H_2O$ | 0.0556 | 0.0278 | 0.0139 |
| | $Na_2$ $EDTA.2H_2O$ | 0.0672 | 0.0336 | 0.0168 |

جدول ۲- غلظت‌های مختلف عناصر پرمصرف و کم‌مصرف در تیمارهای مورد بررسی

**Table 2- Different concentrations of Macro and Micro elements in the investigated treatments**

| تیمار Treatment | یک دوم میکرو ½ Mic | یک برابر میکرو Mic | دو برابر میکرو 2 Mic |
|---|---|---|---|
| نصف ماکرو ½ Mac | ½ Mac × ½ Mac | ½ Mac × Mic | ½ Mac × 2 Mic |
| یک برابر ماکرو Mac | Mac × ½ Mic | Mac × Mic (control) | Mac × 2 Mic |
| دو برابر ماکرو 2 Mac | 2 Mac × ½ Mic | 2 Mac × Mic | 2 Mac × 2 Mic |

1- [2-(N-morpholino) ethane sulphonic acid]

#### کشت ریزنمونه‌ها

برای کشت ابتدا گیاهچه‌ها از داخل شیشه کشت در زیر هود لامینار خارج شده و سپس روی کاغذ صافی استریل شده قرار گرفتند. با استفاده از اسکالپل در زیر هود، قلمه‌های تک گره از وسط شاخساره به‌طول تقریبی یک سانتی‌متر تهیه شد. در مرحله بعد، ریزنمونه‌ها در محیط‌کشت، شامل غلظت‌های مختلف عناصر پرمصرف، کم‌مصرف و ساکارز به‌طور عمودی با رعایت قطبیت قرار داده و در شرایط تاریکی کامل با دمای ۲±۱۸ درجه سانتی‌گراد به‌مدت دو ماه نگهداری شدند.

#### اندازه‌گیری صفات

زمان آغازش ریزغده (مشاهده تورم جوانه جانبی به اندازه دو میلی‌متر)، هر هفته به‌مدت یک ماه یادداشت‌برداری گردید. بعد از تشکیل ریزغده و رشد کافی، دو ماه بعد از کشت، اندازه‌گیری‌های درصد آغازش و تشکیل ریزغده، قطر، طول، وزن، تعداد جوانه رشدیافته روی ریزغده و رکود ریزغده‌ها (تعداد ریزغده دارای جوانه رشدیافته در هر واحد آزمایشی بر تعداد کل ریزغده)، به‌عنوان شاخصی از تولید ریزغده ثبت شد. درصد تشکیل ریزغده (قطر بیش از پنج میلی‌متر) با شمارش تعداد ریزنمونه‌هایی که ریزغده تولید کرده بودند، نسبت به تعداد کل ریزنمونه‌ها برآورد گردید. برای تعیین درصد آغازش ریزغده با قطر حدود دو میلی‌متر نیز به همین ترتیب عمل شد. قطر و طول ریزغده‌ها به‌وسیله خط‌کش و وزن ریزغده با ترازوی حساس (۰/۰۰۰۱ گرم) اندازه‌گیری شد.

#### سرعت آغازش ریزغده

$$\text{سرعت آغازش} = \frac{(n_1\times t_1)+\cdots+(n_n\times t_n)}{t_n} \quad (1)$$

که در آن، n: تعداد ریزغده آغازش شده و t: روز می‌باشد. برای اندازه‌گیری سرعت آغازش ریزغده هر شش روز یک‌بار تعداد ریزغده آغازش شده شمارش شد.

#### استفاده از ریزغده به‌عنوان واحد تکثیر

گلدان‌های دارای پیت، ورمی‌کولایت و پرلایت به نسبت ۱:۱:۱ در دمای ۱۲۱ درجه سانتی‌گراد و فشار یک اتمسفر به‌مدت ۲۰ دقیقه اتوکلاو شدند. سپس سیستم میست در اتاق کشت راه‌اندازی شد. ریزغده‌ها از محل میان‌گره در زیر هود لامینار بریده شده و به گلدان‌ها انتقال داده شدند و سپس آبیاری و به زیر سیستم میست با دمای ۲±۲۵ درجه سانتی‌گراد در شرایط ۱۶ ساعت روشنایی و هشت ساعت تاریکی منتقل گردیدند و به‌مدت یک ماه در این شرایط نگهداری شدند. پس از چهار الی شش روز، گیاهچه‌ها سبز شدند. در طول نگهداری در شرایط آزمایشگاه، هفته‌ای دو مرتبه محلول غذایی ۱۰ برابر رقیق‌شده MS به‌منظور رشد بهتر گیاهچه‌ها، به گیاهان داده شد.

علاوه‌براین، جهت تهیه مجدد ریزنمونه جهت کشت (در صورت نیاز)، ریزغده‌ها پس از برداشت، به محیط‌کشت MS فاقد تنظیم‌کننده‌های رشد منتقل شده و در اتاق رشد در دمای ۲ ± ۲۵ درجه سانتی‌گراد (فتوپریود ۱۶ ساعت روشنایی و هشت ساعت تاریکی) قرار گرفتند. پس از شش الی هفت روز، ریزغده‌ها جوانه زده و برای تهیه گیاهچه‌های درون شیشه‌ای قابل استفاده بودند.

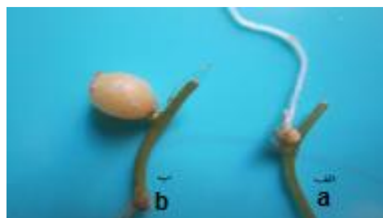
#### تجزیه و تحلیل داده‌ها

این تحقیق به‌صورت آزمایش فاکتوریل در قالب طرح کاملاً تصادفی با سه تکرار و در هر تکرار چهار نمونه اجرا شد. بررسی فرضیات تجزیه واریانس برای تمامی صفات مورد اندازه‌گیری نشان داد که فرضیات تجزیه واریانس (به‌خصوص همگنی واریانس و عدم ارتباط بین واریانس و میانگین) برای تمامی صفات برقرار بوده و نیازی به تبدیل داده و یا هر روش دیگری که باعث برقراری فرضیات تجزیه واریانس شود نبوده و بنابراین، تجزیه واریانس داده‌ها و همبستگی خطی بین صفات با استفاده از نرم‌افزار SPSS ver.21 انجام شد. مقایسات میانگین تیمارها با استفاده از آزمون چنددامنه‌ای دانکن در سطح احتمال پنج درصد انجام و نمودارها با نرم‌افزار Excel ترسیم شد. در این نمودارها، مقدار عددی بار روی هر ستون نشان‌دهنده انحراف استاندارد میانگین تیمار موردنظر می‌باشد.

## نتایج و بحث

### فرآیند آغازش و ریزغده‌زایی

نخستین آغازش ریزغده، چهار روز پس از کشت جوانه جانبی، در محیط‌کشت MS با نصف عناصر پرمصرف دارای ۸۰ گرم در لیتر ساکارز مشاهده شد (داده‌ها نشان داده نشده است). البته در برخی از ریزنمونه‌ها، ریزغده‌های آغازش‌یافته، رشدنکرده (اندازه کمتر از دو میلی‌متر) و بنابراین، جوانه‌های جانبی شروع به رشد کرده (شکل ۱- الف) و در چنین نمونه‌هایی، ریزغده‌ای تشکیل نشد. بعد از دو ماه، طول شاخه‌های رشدیافته از محل گره بین یک الی ۲۵ سانتی‌متر بود (شکل ۲) که در برخی ریزنمونه‌ها، شاخه‌های رشدیافته، تولید شاخه جانبی کردند (شکل ۳). در اکثر تیمارها، ریزغده‌های آغازش شده، رشد کرده و طی دو ماه، اندازه آن‌ها از دو الی نه میلی‌متر متغیر بود (شکل ۱- ب). کشت تعدادی از ریزغده‌های تولیدی روی محیط‌کشت MS بدون هورمون نشان داد که جوانه‌های موجود روی ریزغده‌ها پس از پنج الی هفت روز شروع به رشد کرده و پس از یک ماه گیاهان درون شیشه‌ای مطلوب را تولید کردند (شکل ۴). برخی از ریزنمونه‌ها هیچ ریشه‌ای تولید نکردند، ولی اکثر ریزنمونه‌ها دارای یک الی ۱۶ عدد ریشه بودند که طول آن‌ها بین ۰/۵ الی ۲۰ سانتی‌متر متغیر بود (شکل ۵).




شکل ۱- پاسخ جوانه جانبی به تیمارهای ریزغده‌زایی در سیب‌زمینی رقم 'آگریا' الف) عدم رشد ریزغده آغازش‌یافته و ب) ریزغده رشدیافته

**Figure 1- Lateral bud response to micronodulation treatments for potato cv. Agria a) lack of microgland development and b) Microgland developed**



شکل ۲- رشد شاخساره سیب‌زمینی رقم 'آگریا' از محل گره به‌طول ۲۵ سانتی‌متر

**Figure 2- 25 cm long shoot growth from the node location of potato cv. Agria**



شکل ۳- رشد شاخساره‌های در سیب‌زمینی رقم 'آگریا' از محل گره

**Figure 3- The growth of potato cv. Agria shoots from the location of the node**



شکل ۴- تولید گیاهچه‌های درون شیشه‌ای از ریزغده سیب‌زمینی رقم 'آگریا'

**Figure 4- Production of *in vitro* seedlings from microgland of potato cv. Agria**



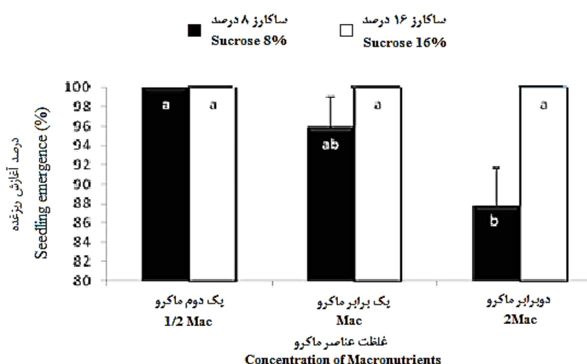
شکل ۵- ریشه‌های رشدیافته از ریزنمونه به‌طول یک الی ۲۰ سانتی‌متر در سیب‌زمینی رقم 'آگریا'

**Figure 5- The roots grown from the explant with a length of 1 to 20 cm in potato cv. Agria**

### درصد آغازش ریزغده

آغازش ریزغده در محیط‌کشت MS (تغییرنیافته) و در تغییریافته‌های آن (هشت محیط‌کشت) مشاهده شد، امّا زمان آغازش و درصد آغازش وابسته به نوع محیط‌کشت و غلظت ساکارز بود. نخستین آغازش ریزغده چهار الی پنج روز پس از کشت جوانه‌های جانبی در محیط‌کشت MS با نصف عناصر پرمصرف به‌همراه ۸۰ گرم در لیتر ساکارز مشاهده شد و به‌طور متوسط در سایر محیط‌های کشت ۱۴ الی ۱۶ روز پس از کشت، آغازش ریزغده شروع شد. غلظت‌های مختلف ساکارز و عناصر پرمصرف در سطح احتمال پنج درصد تأثیر معنی‌داری روی درصد آغازش ریزغده داشتند، امّا اختلاف معنی‌داری بین غلظت‌های مختلف عناصر کم‌مصرف از نظر درصد آغازش ریزغده مشاهده شد. اثر متقابل Suc × Mac بر روی درصد آغازش ریزغده معنی‌دار بود، درحالی‌که سایر اثرات متقابل (Mac × Mic × Suc, Mic × Suc, Mac × Mic) بر درصد آغازش ریزغده تأثیر معنی‌داری نداشتند (جدول ۳). در این آزمایش در محیط‌های کشت دارای ۸۰ گرم در لیتر ساکارز و با افزایش غلظت عناصر پرمصرف، درصد آغازش ریزغده تغییر نکرد و آغازش ریزغده در این تیمارها، ۱۰۰ درصد بود، ولی هنگامی که از ۱۶۰ گرم در لیتر ساکارز استفاده گردید با افزایش غلظت عناصر پرمصرف، کاهش معنی‌داری در درصد آغازش ریزغده‌ها مشاهده شد. حداقل درصد آغازش ریزغده، در محیط‌کشت 2Mac دارای ۱۶۰ گرم در لیتر ساکارز مشاهده گردید. فشار اسمزی در غلظت ۱۶۰ گرم در لیتر ساکارز برای ریزغده‌زایی مناسب بوده و امکان جذب مواد غذایی توسط سلول‌های گیاهی و آغازش ریزغده وجود دارد. احتمالاً افزایش غلظت عناصر پرمصرف و ساکارز، فشار اسمزی را بالاتر از حد بهینه برده و این امر نتیجه معکوس در پی داشته است. همچنین ممکن است کاهش غلظت عناصر، باعث رقیق شدن محیط‌کشت و جذب راحت‌تر آب و مواد غذایی توسط گیاه گردد. به نظر می‌رسد که افزایش فشار اسمزی در حد بهینه، سبب تحریک و افزایش رشدونمو شده و پس از رسیدن به یک حد بهینه رشد و شکل‌گیری اندام، بر اثر توقف جذب آب متوقف می‌شود. از طرف دیگر، با کاهش غلظت عناصر پرمصرف به ½ Mac در هر دو غلظت ساکارز، آغازش ریزغده‌ها ۱۰۰ درصد بود، بنابراین می‌توان گفت که غلظت ۸۰ گرم در لیتر ساکارز و ½ Mac از نظر درصد آغازش ریزغده و جنبه اقتصادی مناسب‌تر از سایر تیمارها می‌باشد. در محیط‌کشت ½ Mac، آغازش غده در *Gloriosa rothschildiana* بالاتر از محیط‌کشت Mac بود (Kozak, 2003). گزارشات قبلی نیز بر این امر تأکید دارد که برای ریزغده‌زایی باید غلظت‌های ساکارز را مورد بررسی قرار داد (Seabrook *et al.*, 2004; Hussain *et al.*, 2006). کارلسون و همکاران (Carlson *et al.*, 2004) گزارش کردند که بهترین محیط‌کشت برای القاء ریزغده، محیط‌کشت MS همراه با ۸۰ گرم در لیتر ساکارز می‌باشد. غلظت ۸۰ گرم در لیتر ساکارز در مقایسه با غلظت ۴ و ۱۲ گرم در لیتر ساکارز سبب افزایش در آغازش ریزغده‌ها گردید (Garner & Blake, 1989).

آغازش ریزغده در غلظت‌های مختلف عناصر کم‌مصرف از ۹۵/۰۸ تا ۹۸/۱۱ درصد متغیر بود و از نظر آماری تفاوتی بین غلظت‌های مختلف عناصر کم‌مصرف وجود نداشت (شکل ۶). بنابراین، برای آغازش ریزغده از جوانه جانبی، نیاز به مقادیر کمتر عناصر کم‌مصرف (½ Mac) می‌باشد. این امر نشان داد که برای آغازش ریزغده‌ها، مقدار عناصر کم‌مصرف بحرانی نبوده و آغازش ریزغده وابسته به عناصر کم‌مصرف نمی‌باشد. احتمال می‌رود که حتی در مقادیر پایین‌تر عناصر کم‌مصرف نیز آغازش ریزغده مشاهده شود. همچنین مقادیر عناصر کم‌مصرف روی فشار اسمزی محلول بی‌تأثیر بوده و چون آغازش ریزغده عمدتاً وابسته به فشار اسمزی است، بنابراین با دو برابر کردن مقادیر عناصر Mic، فشار اسمزی در حد ناچیز افزایش پیدا کرده که همراه با تأمین بهتر مواد غذایی لازم برای سلول‌های تحریک شده، باعث مقداری افزایش در درصد آغازش ریزغده شده است. قندها و عناصر پرمصرف، بیشترین تأثیر را در پتانسیل اسمزی کل محیط‌کشت دارند (George, 1993).




**شکل ۶- درصد آغازش ریزغده سیب‌زمینی رقم آگریا در غلظت‌های مختلف ساکارز و عناصر پرمصرف**

**Figure 6- The microtuber initiation of potato cv. Agriain different concentrations of sucrose and macro elements (DMRT, *p≤0.05*)**

جدول ۳- تجزیه واریانس اثر عوامل مورد بررسی بر صفات موردمطالعه سیب‌زمینی رقم آگریا

Table 3- ANOVA for the effect of the studied factors on the studied traits of potato cv. Agria

| منابع تغییرات S.O.V | درجه آزادی df | میانگین مربعات Mean square | | | | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | | آغازش ریزغده Microtuber initiation | تشکیل ریزغده Microtuber formation | سرعت آغازش ریزغده Microtuber initiation rate | طول ریزغده Microtuber length | قطر ریزغده Microtuber diameter | وزن ریزغده Microtuber weight | تعداد جوانه روی ریزغده Number of buds per microtuber | تعداد شاخه Number of shoot | رکود Dormancy |
| عناصر پرمصرف Mac | 2 | 158.14* | 517.32$^{ns}$ | 1.47$^{ns}$ | 1.36$^{ns}$ | 1.32$^{ns}$ | 0.05$^{ns}$ | 1.47$^{ns}$ | 0.08ns | 818.36$^{ns}$ |
| عناصر کم‌مصرف Mic | 2 | 58.75$^{ns}$ | 669.84$^{ns}$ | 0.80$^{ns}$ | 0.57$^{ns}$ | 1.70$^{ns}$ | 94.72$^{ns}$ | 2.95$^{ns}$ | 0.06$^{ns}$ | 228.89$^{ns}$ |
| ساکارز Suc | 1 | 371.90* | 9.84$^{ns}$ | 4.4* | 6.40$^{ns}$ | 2.04$^{ns}$ | 65.06$^{ns}$ | 5.33$^{ns}$ | 0.32$^{ns}$ | 1143.95$^{ns}$ |
| عناصر پرمصرف ×عناصر کم‌مصرف Mac × Mic | 4 | 19.39$^{ns}$ | 325.83$^{ns}$ | 0.38$^{ns}$ | 1.88$^{ns}$ | 0.67$^{ns}$ | 156.62$^{ns}$ | 0.95$^{ns}$ | 0.04$^{ns}$ | 510.42$^{ns}$ |
| عناصر پرمصرف × ساکارز Mac × Suc | 2 | 158.14* | 3581.99* | 0.04* | 9* | 13.24* | 1622.88$^{ns}$ | 15.83* | 0.66* | 606.97$^{ns}$ |
| عناصر کم‌مصرف × ساکارز Mic × Suc | 2 | 58.75$^{ns}$ | 193.13$^{ns}$ | 0.54$^{ns}$ | 3.85$^{ns}$ | 1.63$^{ns}$ | 358.66$^{ns}$ | 0.60$^{ns}$ | 0.05$^{ns}$ | 95.07$^{ns}$ |
| عناصر پرمصرف × عناصر کم‌مصرف × ساکارز Mac × Mic × Suc | 4 | 19.39$^{ns}$ | 402.41$^{ns}$ | 0.38$^{ns}$ | 1.47$^{ns}$ | 0.23$^{ns}$ | 209.2$^{ns}$ | 1.65$^{ns}$ | 0.02$^{ns}$ | 1209.61$^{ns}$ |
| خطا Error | 33 | 62.96 | 1217.50 | 0.71 | 2.55 | 1.94 | 353.26 | 2.32 | 0.14 | 1002.21 |

ns، **و *: به‌ترتیب عدم معنی‌داری، معنی‌داری در سطح احتمال یک و پنج درصد

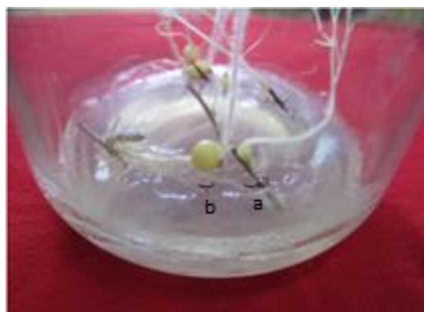
ns, ** and *: non-significant, and significant at $p \leq 0.01$ and $p \leq 0.05$, respectively

### درصد تشکیل ریزغده

در اکثر تیمارها و ریزنمونه‌ها، پس از آغازش ریزغده‌ها در محل گره، ریزغده‌ها در طی دو ماه تشکیل شدند (شکل ۷- ب). بااین‌حال، در تیمارهایی که به‌دلیل شرایط نامناسب، ریزغده‌های آغازش یافته رشد نکرده بودند، جوانه‌های جانبی شروع به رشد کرده و ریزغده‌ای در محل گره تولید نشد (شکل ۷-الف). در محیط‌کشت MS (شاهد)، میانگین تشکیل ریزغده برابر ۲۳/۳۵ درصد و در محیط‌های‌کشت MS تغییریافته ۲۷/۳۳ درصد بود (شکل ۸). اختلاف معنی‌داری بین غلظت‌های مختلف عناصر پرمصرف، عناصر کم‌مصرف و ساکارز از نظر درصد تشکیل ریزغده وجود نداشت. بااین‌حال، درصد تشکیل ریزغده به‌طور معنی‌داری تحت تأثیر اثر متقابل Mac × Suc قرار گرفت، درحالی‌که سایر اثرات متقابل دوگانه و سه‌گانه معنی‌دار نبودند (جدول ۳). حداقل درصد تشکیل ریزغده در غلظت ۱۶۰ گرم در لیتر ساکارز، در محیط‌کشت ½ Mac حاصل شد و با افزایش غلظت عناصر پرمصرف، درصد تشکیل ریزغده نیز به‌طور معنی‌داری افزایش یافت. به‌طوری‌که درصد تشکیل ریزغده در ½ Mac، ۳۶ درصد و در 2Mac، ۷۱ درصد بود. بنابراین، در محیط‌کشت حاوی ۱۶۰ گرم در لیتر ساکارز، اضافه‌کردن عناصر پرمصرف باعث افزایش معنی‌داری در تشکیل ریزغده شد. حداقل درصد تشکیل ریزغده در محیط‌کشت MS (شاهد) دارای ۸۰ گرم در لیتر ساکارز نسبت به ½ Mac از درصد تشکیل ریزغده کمتری برخوردار بود؛ لذا می‌توان چنین نتیجه گرفت که در رقم آگریا، محیط‌کشت MS تغییریافته (1/2 Mac) دارای ۸۰ گرم در لیتر ساکارز، باعث بهبود تشکیل ریزغده می‌شود. از طرف دیگر، محیط‌کشت 2 Mac دارای ۱۶۰ گرم در لیتر از درصد تشکیل ریزغده بالایی برخوردار بود. بااین‌حال، برای کاهش هزینه‌ها، محیط‌کشت ½ Mac دارای ۸۰ گرم در لیتر ساکارز نسبت به سایر تیمارها ترجیح داده می‌شود. به‌کار بردن غلظت شش الی ۱۰ گرم در لیتر ساکارز سبب تشکیل ریزغده گردید (Bhojwani & Razdan, 1996). آلتیندال و کارادوگان (Altindal & Karadogan, 2011) نشان دادند که نوع منبع کربن و غلظت به‌کار رفته برای هر رقم متفاوت می‌باشد، به‌طوری‌که محیط‌کشت پایه MS دارای شش گرم در لیتر ساکارز در رقم آگریا و چهار درصد مالتوز در رقم جاستین، بهترین محیط‌های کشت برای ریزغده‌زایی بودند. در غلظت‌های مختلف عناصر کم‌مصرف، درصد تشکیل ریزغده از ۴۹ تا ۶۰ درصد متغیر بود و از نظر آماری اختلاف معنی‌داری بین غلظت‌های مختلف عناصر کم‌مصرف مشاهده نشد. بنابراین، استفاده از غلظت‌های بالا یا پایین عناصر کم‌مصرف بر تشکیل بهینه ریزغده اثری نداشته و می‌توان از غلظت پایین عناصر کم‌مصرف استفاده نمود.

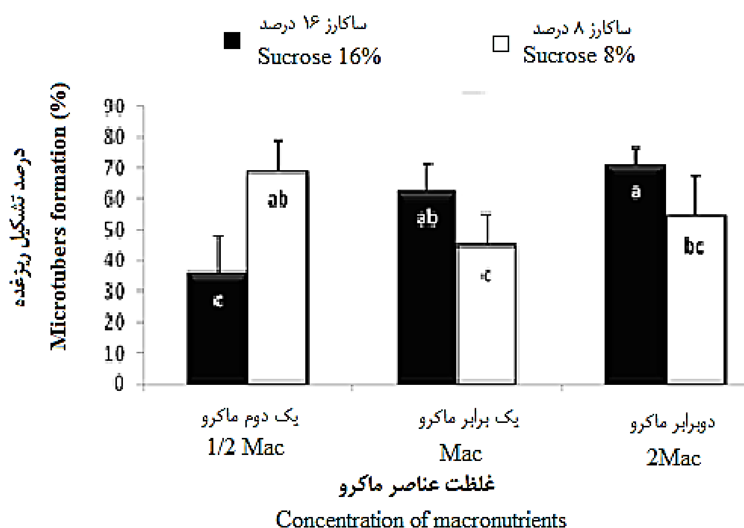
### سرعت آغازش ریزغده

در هر محیط‌کشت، شروع ریزغده‌زایی از یک ریزنمونه به ریزنمونه دیگر متفاوت بود. همچنین اختلاف زمانی بین شروع ریزغده‌زایی در ریزنمونه‌های کشت شده در یک محیط‌کشت وجود داشت، به‌طوری‌که در برخی از ریزنمونه‌ها چهار الی پنج روز بعد از کشت، آغازش ریزغده مشاهده شد و در تعداد دیگری از ریزنمونه‌ها پس از ۱۴ الی ۱۶ روز آغازش ریزغده شروع شد. اختلاف معنی‌داری بین دو غلظت ساکارز از نظر سرعت آغازش ریزغده وجود داشت، درحالی‌که سرعت آغازش ریزغده تحت تأثیر غلظت‌های مختلف عناصر کم‌مصرف و پرمصرف قرار نگرفت. از بین اثرات متقابل، فقط اثر متقابل Mac × Suc تأثیر معنی‌داری روی سرعت آغازش ریزغده داشت. این نتایج نشان داد که غلظت‌های مختلف عناصر پرمصرف و کم‌مصرف نتوانست به‌طور معنی‌داری سرعت آغازش ریزغده‌ها را تغییر دهد. بااین‌حال، زمانی‌که غلظت‌های مختلف عناصر پرمصرف را به‌همراه درصدهای مختلف ساکارز در نظر بگیریم، سرعت آغازش ریزغده‌ها از اثر توأم این دو فاکتور به‌طور معنی‌داری متأثر شدند. نتایج حاصل از مقایسه میانگین نشان داد که کمترین سرعت آغازش ریزغده مربوط به محیط‌کشت 2Mac دارای ۱۶۰ گرم در لیتر ساکارز بود. سایر تیمارها از سرعت آغازش ریزغده مناسب و حداکثری برخوردار بودند. این امر احتمالاً به این خاطر می‌باشد که در محیط‌کشت 2 Mac دارای ۱۶۰ گرم در لیتر ساکارز، فشار اسمزی بالا، باعث تأخیر در آغازش ریزغده‌ها شده که نهایتاً پس از یک ماه، درصد آغازش ریزغده در این تیمار نسبت به سایر تیمارها کمتر بود. این درحالی است که فشار اسمزی بالا در بهبود تشکیل ریزغده‌ها مؤثر می‌باشد (شکل ۹). لذا محیط‌کشت 2 Mac دارای ۱۶۰ گرم در لیتر ساکارز برای تشکیل ریزغده تیمار مناسبی است، هرچند که از سرعت آغازش پایین‌تری برخوردار باشد. ساکارز یکی از محرک‌های بحرانی برای تشکیل ریزغده است و به‌عنوان یک منبع رطوبت بذر و منبع انرژی و نیز در غلظت‌های بالاتر به‌عنوان سیگنالی برای تشکیل ریزغده ضروری است (Hussain *et al.*, 2006). یو و همکاران (Yu *et al.*, 2000) گزارش کردند که سرعت رشد ریزغده‌ها در غلظت ۸۰ گرم در لیتر ساکارز خیلی بالاتر از زمانی بود که از چهار گرم در لیتر ساکارز در محیط‌کشت استفاده شد. سرعت آغازش ریزغده در غلظت‌های مختلف عناصر کم‌مصرف از ۲/۸۷۷ تا ۳/۲۹۵ متغیر بود. بااین‌حال، از نظر آماری تفاوتی بین غلظت‌های مختلف عناصر کم‌مصرف وجود نداشت. به‌دلیل اینکه سرعت آغازش ریزغده عمدتاً وابسته به فشار اسمزی است و عناصر کم‌مصرف نقش بارزی در فشار اسمزی ندارند، بنابراین با دو برابر کردن مقادیر Mic، مواد غذایی بیشتری تأمین خواهد شد و باعث مقداری افزایش در سرعت آغازش ریزغده شده است.



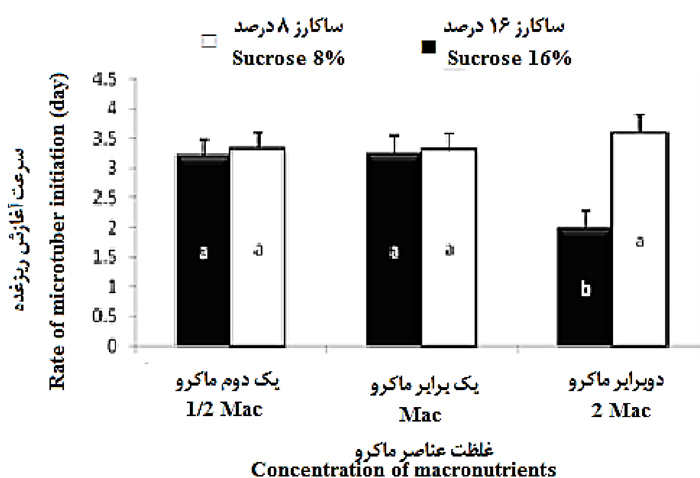

شکل ۷- فرآیند ریزغده‌زایی سیب‌زمینی رقم آگریا پس از دو ماه: الف- عدم رشد ریزغده آغازش یافته و تبدیل شدن به شاخه ب- ریزغده رشد یافته

**Figure 7- The process of micrituber formation of potato cv. Agria after two months: A- The lack of developed microtuber and B- Developed microtuber**




شکل ۸- درصد تشکیل ریزغده سیب‌زمینی رقم آگریا در غلظت‌های مختلف ساکارز و عناصر پرمصرف

**Figure 8- The percentage of microtuber formation of potato cv. Agria in different concentrations of sucrose and macro elements (DMRT, $p \leq 0.05$)**




شکل ۹- سرعت آغازش ریزغده سیب‌زمینی رقم آگریا در غلظت‌های مختلف ساکارز و عناصر پرمصرف

**Figure 9- The microtuber initiation rate per day of potato cv. Agria in different concentrations of sucrose and macro elements (DMRT, $p \leq 0.05$)**

## طول ریزغده

در تیمارهای مورد بررســی، طول ریزغده از دو الی نه میلی‌متر متغیر بود (شــکل ۱۰). طول ریزغده تحت تأثیر غلظت‌های مختلف عناصر پرمصرف، عناصر کم‌مصرف و ساکارز قرار نگرفت. به‌غیر از اثرمتقابل Suc × Mac، ســایر اثرات متقابل روی طول ریزغده تأثیر معنی‌داری نداشــتند. طویل‌ترین ریزغده با میانگین ۴/۲ میلی‌متر در محیط‌کشت 2Mac دارای ۱۶۰ گرم در لیتر ساکارز مشاهده شد، ولی اختلاف معنی‌داری با محیط‌کشــت تغییرنیافته Mac تکمیل شــده با ۱۶۰ گرم در لیتر ساکارز نداشت، تغییر غلظت عناصر پرمصرف به ½ Mac، سبب کاهش طول ریزغده (به کمترین مقدار، ۲/۱ میلی‌متر)، در بین تیمارهای به‌کار رفته شد. در غلظت ۸۰ گرم در لیتر ساکارز، طول ریزغده با کاهش غلظت عناصــر پرمصــرف، از 2 Mac به Mac ثابت مانده و سپس در ½ Mac افزایش نشان داد، ولی این افزایش معنی‌دار نبود (شــکل ۱۱). با توجه به نقش عناصــر پرمصــرف می‌توان چنین استنباط کرد که یونی مانند یون کلسیم که در محیط‌کشت به‌صورت نمک کلرید کلسیم وجود دارد، علاوه‌بر نقش‌های متعددی مانند حضور در ساختمان و پروتئین‌های غشاء سلولی و تیغه میانی دیواره سلولی و ساخت سلولز، فعال‌کننده تعدادی از آنزیم‌های مسئول تقسیم سلولی و طویل شــدن ســلول می‌باشد (Shacklock *et al.*, 1992; Jones, 1998; Mengel & Kirby, 1987). نیتروژن نیز برای ســاختن اسیدآمینه تریپتوفان (ماده اولیه برای ساخت اکسین) لازم می‌باشـد (George, 1993)، با کاهش غلظت این عناصر در محیط‌کشت، سنتز اکسین که یکی از وظایف آن طویل شـدن و توسعه سـلولی اسـت، کاهش می‌یابد. در نتیجه، رشــد ســلول‌ها با کاهش غلظت عناصــر پرمصــرف کاهش می‌یابد و سـبب کاهش طول ریزغده می‌شـود و با توجه به اینکه ریزغده یک اندام ذخیره‌ای برای نشاسـته می‌باشـد، به مقادیر ســاکارز بالاتری نیاز دارد، بنابراین با افزایش غلظت ســاکارز می‌توان انتظار داشــت که ریزغده‌های بزرگ‌تری تولید شــود. طول ریزغده در غلظت‌های مختلف عناصــر کم‌مصــرف از ۱/۷ تا ۲/۳ میلی‌متر متغیر بود. بااین‌حال، از نظر آماری اختلاف معنی‌داری بین غلظت‌های مختلف عناصر کم‌مصرف مشاهده نشـد و می‌توان چنین استنباط کرد که طول ریزغده مستقل از اثرات عناصر کم‌مصرف بوده و وابسـتگی زیادی به غلظت‌های ساکارز و عناصر پرمصـرف دارد. در کل، در صــورت بهینه بودن ســایر عوامل مؤثر در ریزغده‌زایی، غلظت‌های بالای ساکارز می‌تواند در تولید و رشد ریزغده‌های بزرگ‌تر مفید باشد (Yu *et al.*, 2000; Shibli *et al.*, 2001).

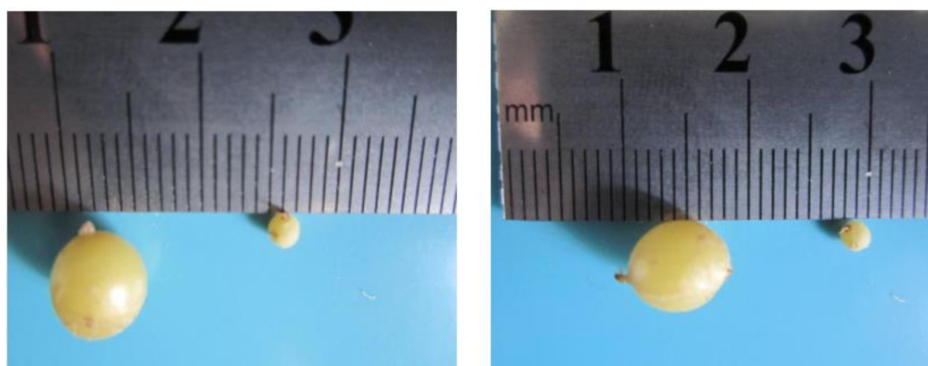
## قطر ریزغده

قطر ریزغده تحت تأثیر فاکتورهای مورد مطالعه قرار نگرفت، ولی اثرمتقابل دوگانه Suc × Mac تـأثیر معنی‌داری روی قطر ریزغده داشت. قطر ریزغده از ۱/۷ الی چهار میلی‌متر متغیر می‌باشد و این امر نشان داد که در محیط‌های کشت مورد استفاده، قطر ریزغده مناسبی به‌دست آمده است. با این‌حال، قطورترین ریزغده‌ها در محیط‌کشت 2 Mac که با ۱۶۰ گرم در لیتر ساکارز تکمیل شده بود، به‌دست آمد. این درحالی است که قطر ریزغده‌ها در محیط‌کشت MS (شاهد) در هر دو غلظت ساکارز و نیز در محیط‌کشت ½ Mac تکمیل شـده با ۸۰ گرم در لیتر سـاکارز بیشــتر بود. در دو محیط‌کشـت (محیط‌کشـت 2Mac همراه با ۸۰ گرم در لیتر سـاکارز و نیز محیط‌کشـت ½ Mac به‌همراه ۱۶۰ گرم در لیتر ســاکارز)، قطر ریزغده‌ها کم‌تر بود (شــکل ۱۲). ریزغده‌ها یک منبع با ارزش برای نگهداری ژرم‌پلاســم ســیب‌زمینی می‌باشند. در تحقیقی که روی شش ژنوتیپ مختلف سیب‌زمینی انجام گردید، مشخص شد که فقط ریزغده‌هایی با قطر بیش از پنج میلی‌متر توانسـتند بعد از سـه سـال انبارداری، بقاء خود را حفظ نمایند. از طرفی دیگر، روند تولید ریزغده وابسـته به غلظت سـاکارز بود، به‌طوری‌که در محیط‌های کشــت دارای ۱۶۰ گرم در لیتر ســاکارز با افزایش غلظت عناصر پرمصـرف، افزایش در قطر ریزغده‌ها مشاهده شـده و برعکس زمانی‌که محیط‌کشــت دارای ۸۰ گرم در لیتر ســاکارز بود، کاهش در غلظت عناصــر پرمصــرف باعث افزایش قطر ریزغده‌ها گردید. قطر ریزغده‌ها در غلظت‌های مختلف عناصــر کم‌مصــرف از ۲/۴۷ تا ۳/۱۱ میلی‌متر متغیر بود و با کاهش غلظت عناصــر کم‌مصــرف، افزایش ناچیزی در قطر ریزغده‌ها مشــاهده شــد، ولی اختلاف معنی‌داری بین Mic، ½ Mic و 2Mic وجود نداشــت و می‌توان از غلظت پایین عناصر کم‌مصرف استفاده نمود. در میان سه غلظت مختلف ساکارز (صـفر، شــش و هشــت گرم در لیتر) بزرگ‌ترین ریزغده تولیدی (۴/۳ میلی‌متر) در محیط‌کشــت شش گرم در لیتر ساکارز همراه با ۱۲ گرم در لیتر BAP مشاهده گردید (Imani *et al.*, 2010).

## تعداد جوانه روی ریزغده

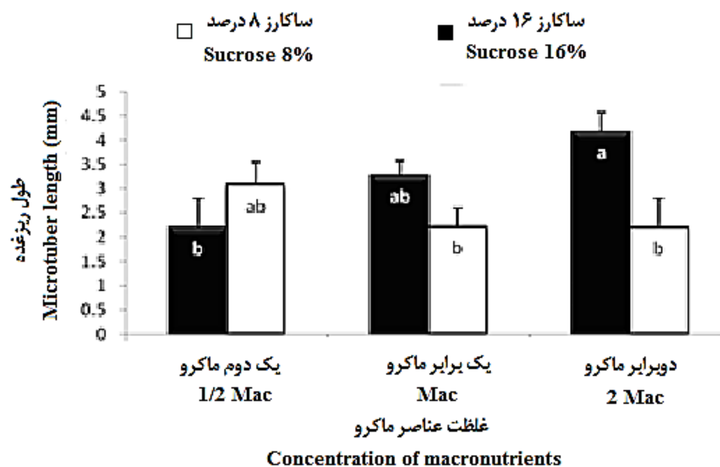
سیب‌زمینی از جمله محصولاتی می‌باشد که توسط اندام رویشی تکثیر می‌گردد و بـا توجه بـه اینکـه ریزغده یـک انـدام برای تکثیر می‌باشـد، با افزایش تعداد جوانه روی ریزغده، محصـول بیشـتری تولید خواهد شد. با اعمال تیمارهای مختلف، تعداد جوانه روی ریزغده‌ها بین یک الی نه جوانه متغیر بود. تعداد جوانه روی ریزغده، از غلظت‌های مختلف عناصر کم‌مصرف، پرمصرف و ساکارز متأثر نگردید. از طرف دیگر، تعداد جوانه تحت تأثیر اثرمتقابل Suc × Mac قرار گرفت و ســایر اثرات متقابل بر تعداد جوانه معنی‌دار نبودند. تعداد جوانه روی ریزغده به غلظت‌های عناصــر پرمصــرف و ســاکارز وابســته بود، بـه‌طوری‌کـه بـالاترین تعداد جوانـه (۴/۲۳۱) روی هر ریزغده زمـانی به‌دست آمد که ریزنمونه‌ها در محیط‌کشت 2Mac دارای ۱۶۰ گرم در لیتر سـاکارز قرار گرفتند، در صـورتی‌که در محیط‌کشـت 2Mac دارای

۸۰ گرم در لیتر ساکارز، کمترین تعداد جوانه (۱/۵۰۹) مشاهده گردید. در محیط‌کشت Mac متوسط، تعداد ریزغده در ۱۱۶۰ گرم در لیتر ساکارز بیشتر از ۸۰ گرم در لیتر ساکارز بود، ولی اختلاف معنی‌داری بین دو غلظت ۸۰ و ۱۶۰ گرم در لیتر ساکارز مشاهده نگردید (شکل ۱۳). در محیط‌کشت ½ Mac، متوسط تعداد جوانه روی ریزغده در ۸۰ گرم در لیتر ساکارز بالاتر از ۱۶۰ گرم در لیتر بود، ولی اختلاف معنی‌داری را نشان نداد. این نتایج نشان داد که محیط‌کشت تغییریافته 2Mac دارای ۸۰ گرم در لیتر ساکارز و ½ Mac دارای ۱۶۰ گرم در لیتر ساکارز، تحت این شرایط قادر به تولید ریزغده‌هایی با تعداد جوانه بیشتر از دو عدد نبودند. ازآن‌جایی‌که افزایش تعداد جوانه روی ریزغده، منجر به افزایش عملکرد ریزغده در محصول می‌شود، بنابراین استفاده از تیمارهایی با غلظت بالاتر ساکارز و عناصر پرمصرف مناسب‌تر می‌باشد. در غلظت‌های مختلف عناصر کم‌مصرف، تعداد جوانه روی ریزغده از ۲/۴ تا ۳/۲ عدد متغیر بود، ولی از نظر آماری تفاوتی بین غلظت‌های مختلف عناصر کم‌مصرف مشاهده نگردید. بنابراین، استفاده از غلظت‌های بالا یا پایین عناصر کم‌مصرف بر تشکیل تعداد جوانه اثری نداشته و می‌توان از غلظت پایین عناصر کم‌مصرف استفاده نمود.




**شکل ۱۰- طول ریزغده (راست) و قطر ریزغده (چپ) در سیب‌زمینی رقم 'آگریا'**

**Figure 10- Microtuber length (right) and the microtuber diameter of (left) of potato cv. Agria**




**شکل ۱۱- طول ریزغده سیب‌زمینی رقم 'آگریا' در غلظت‌های مختلف ساکارز و عناصر پرمصرف**

**Figure 11- The microtuber length of potato cv. Agria in different concentrations of sucrose and macro elements (DMRT, $p \leq 0.05$)**

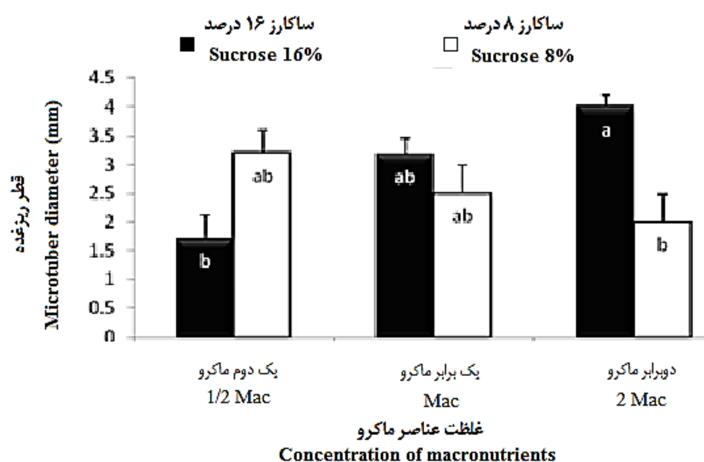
**رکود**

در تعدادی از ریزغده‌های تولیدی در محیط‌های کشت مورد بررسی، جوانه‌های موجود روی ریزغده، شروع به رشد کردند و این امر نشان داد که این ریزغده‌ها فاقد رکود بودند. رشد جوانه به‌دلیل نداشتن دوره خواب در ریزغده‌های تولیدی اتفاق می‌افتاد. عدم وجود دوره خواب، عامل محدودکننده در استفاده از ریزغده‌ها به‌عنوان بذر گواهی شده می‌باشد که برای کوتاه کردن کارهای کشت بافت، عدم وجود رکود مفید است (Leclerc & Donnelly, 1995). عوامل متعددی از قبیل ژنوتیپ، اندازه ریزغده، مدت زمان قرار گرفتن ریزغده‌ها در محیط‌کشت، تنظیم‌کننده‌های رشد، بلوغ جوانه و سطح داخلی ABA

بر خواب ریزغده‌ها اثر می‌گذارند (Hemberg, 1985). تجزیه و تحلیل داده‌های مربوط به درصد رکود ریزغده‌ها نشان داد که اثرات ساده و متقابل فاکتورهای مورد مطالعه روی درصد رکود ریزغده‌ها معنی‌دار نبودند، لذا غلظت‌های مختلف عناصر پرمصرف، عناصر کم‌مصرف و ساکارز، رکود یکسانی را ایجاد کردند و به‌طور متوسط ۷۳/۶۵ درصد ریزغده‌ها، دارای رکود بودند.

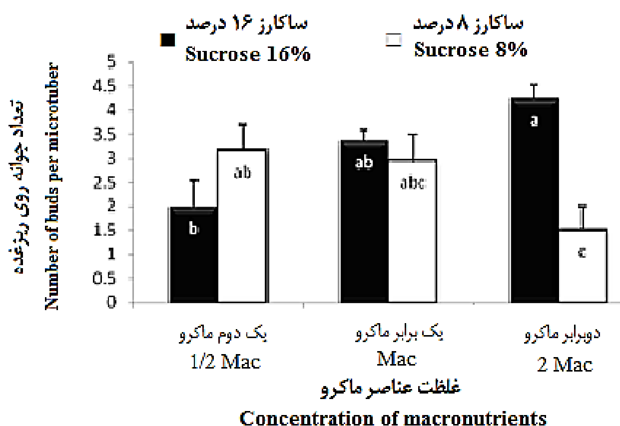
## تعداد شاخه رشدیافته از محل گره

شاخساره‌های رشدیافته، دارای طولی بین یک الی ۲۵ سانتی‌متر بودند که گاهی روی شاخساره اصلی، شاخساره‌های جانبی نیز تشکیل شد. تعداد شاخه رشدیافته از محل گره تحت تأثیر اثر متقابل ساکارز و عناصر پرمصرف قرار گرفت. کمترین تعداد شاخساره در محیط‌کشت 2Mac دارای ۱۶۰ گرم در لیتر ساکارز به‌دست آمد و با توجه به اینکه در این محیط‌کشت، میزان غده تشکیل شده حداکثر بوده، طبیعی است که تعداد شاخه حداقل باشد (شکل ۱۴). گزارش‌ها نشان داد که سطوح کم ساکارز (سه گرم در لیتر) در محیط‌کشت ریزغده‌زایی، شاخساره‌های طبیعی را تولید می‌کنند و هیچ ریزغده‌ای تشکیل نشد. بنابراین، سطوح کم ساکارز مسئول رشد رویشی شاخساره در سیب‌زمینی هستند (Hussain *et al.*, 2006; Khuri & Moorby, 1995). پژوهش‌های فوجینو و همکاران (Fujino *et al.*, 1995) نشان داد که افزایش ساکارز از سه به هشت گرم در لیتر، سبب توقف طویل شدن شاخه‌ها و متورم شدن ناحیه زیر هر یک از شاخه‌ها می‌شود. تتسومورا و همکاران (Tetsumura *et al.*, 2008) گزارش کردند که کاهش در غلظت محیط‌کشت MS سبب افزایش تشکیل ریشه و شاخه در *Vaccinium corymbosum* گردید.



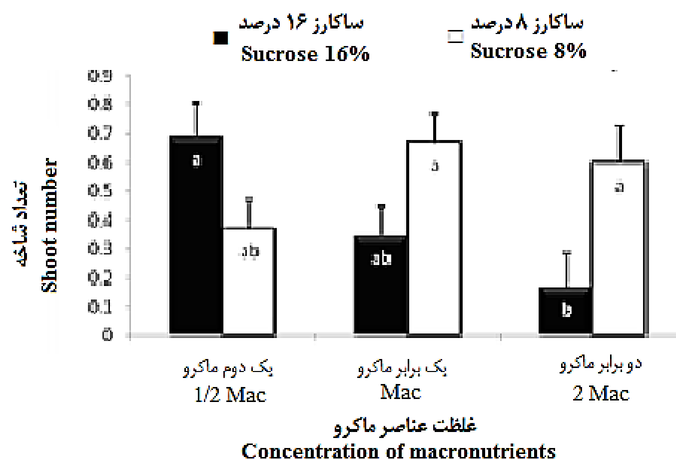

**شکل ۱۲- قطر ریزغده سیب‌زمینی رقم آگریا در غلظت‌های مختلف ساکارز و عناصر پرمصرف**

**Figure 12- The microtuber diameter of potato cv. Agria in different concentrations of sucrose and macro elements (DMRT, $p \leq 0.05$)**




**شکل ۱۳- تعداد جوانه سیب‌زمینی رقم آگریا روی هر ریزغده در غلظت‌های مختلف ساکارز و عناصر پرمصرف**

**Figure 13- The number of buds on per microtuber of potato cv. Agria in different concentrations of sucrose and macro elements (DMRT, $p \leq 0.05$)**

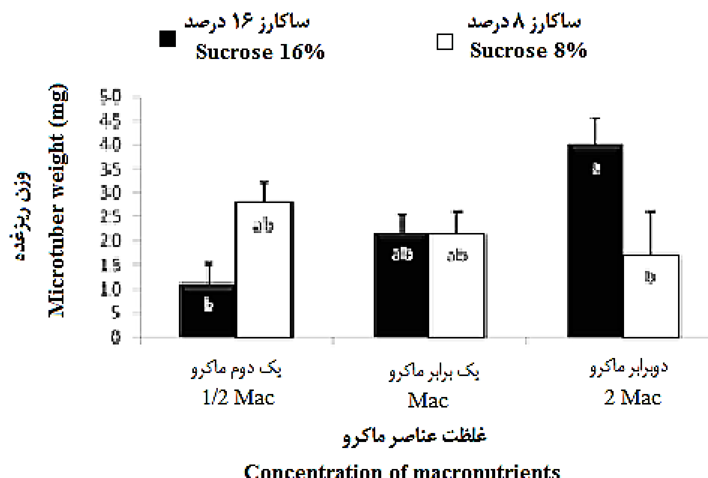



**شکل ۱۴- تعداد شاخه سیب‌زمینی رقم آگریا در غلظت‌های مختلف ساکارز و عناصر پرمصرف**

**Figure 14- The shoot number of potato cv. Agria in different concentrations of sucrose and macro elements (DMRT, $p \le 0.05$)**

## وزن ریزغده‌ها

وزن ریزغده‌ها، به‌عنوان یک عامل اصلی در تولید غده محسوب می‌شود، به‌طوری‌که ریزغده‌هایی با وزن کم، گیاهچه‌هایی با تعداد غده کمی تولید خواهند کرد (Donnelly *et al.*, 2003). بنابراین، بهینه‌سازی شرایط تولید ریزغده می‌تواند بر عملکرد مزرعه‌ای سیب‌زمینی تأثیرگذار باشد (Dwiati & Anggorowati, 2011). در این آزمایش، وزن ریزغده‌ها بین هفت تا ۱۰۳ میلی‌گرم متغیر بود که نشان‌دهنده بالا بودن وزن ریزغده‌های تولیدی از وزن تعریفی برای ریزغده‌ها می‌باشد. تجزیه واریانس داده‌ها نشان داد که غلظت‌های مختلف عناصر کم‌مصرف، پرمصرف و ساکارز تأثیر معنی‌داری بر وزن ریزغده نداشتند. این امر نشان می‌دهد که وزن ریزغده‌ها از اثرات انفرادی فاکتورهای مورد مطالعه متأثر نشد. بااین‌حال، اثر متقابل Suc × Mac روی وزن ریزغده معنی‌دار بود، این درحالی است که سایر اثرات متقابل دوگانه و سه‌گانه بر وزن ریزغده معنی‌دار نبودند. وزن ریزغده در محیط‌کشت 2Mac دارای ۱۶۰ گرم در لیتر ساکارز، تقریباً دو برابر محیط‌کشت MS (شاهد) دارای ۸۰ یا ۱۶۰ گرم در لیتر ساکارز بود که این امر نشان‌دهنده بهبود عوامل تغذیه‌ای با دو برابر کردن غلظت عناصر پرمصرف می‌باشد. از طرف دیگر، با کاهش غلظت عناصر پرمصرف نسبت به محیط‌کشت MS (شاهد)، کاهش در وزن ریزغده‌ها در محیط‌کشت دارای ۱۶۰ گرم در لیتر ساکارز مشاهده گردید که نشان‌دهنده برهم‌خوردن تعادل بین مواد معدنی و غلظت منبع کربن می‌باشد (شکل ۱۵). برهم‌خوردن تعادل مواد معدنی و منبع کربن در تیمار دیگری نیز مشاهده گردید. به‌طوری‌که در محیط‌کشت تغییریافته 2Mac، دارای ۱۶۰ گرم در لیتر ساکارز، وزن ریزغده دو برابر محیط‌کشت 2Mac، دارای ۸۰ گرم در لیتر ساکارز بود. بنابراین، غلظت‌های بالای ساکارز در ریزغده‌زایی و افزایش وزن ریزغده‌ها مؤثر می‌باشد. اثر غلظت محیط کشت پایه روی جنین‌زایی سوماتیکی در مارچوبه بررسی شد و نتایج نشان داد که غلظت‌های محیط‌کشت پایه، روی رشد شاخساره‌ها تأثیر معنی‌داری داشت، علاوه‌براین، وزن تر شاخساره‌ها در تیمار 2MS دوبرابر MS بود (Mamiya & Sakmoto, 1999). بررسی روند تغییرات وزن ریزغده‌ها نشان داد که وزن ریزغده‌ها در محیط‌های‌کشت دارای ۱۶۰ گرم در لیتر ساکارز با افزایش غلظت عناصر پرمصرف افزایش نشان داد. این درحالی است که در محیط‌های کشت دارای ۸۰ گرم در لیتر ساکارز، کاهش معنی‌داری در وزن ریزغده‌ها با افزایش غلظت عناصر پرمصرف مشاهده شد. به عبارت دیگر، زمانی‌که غلظت عناصر پرمصرف افزایش می‌یابد، برای به‌دست آوردن ریزغده‌های با وزن بالا، بایستی غلظت ساکارز افزایش یابد تا علاوه‌بر تأمین مواد معدنی، انرژی لازم برای تجمع مواد نشاسته‌ای در ریزغده‌ها نیز فراهم شود. علت پایین بودن وزن ریزغده‌ها در ۸۰ گرم در لیتر ساکارز یا در غلظت‌های پایین‌تر از ۸۰ گرم در لیتر، می‌تواند به این دلیل باشد که در محیط‌کشت، ساکارز به‌راحتی به گلوکز و فروکتوز تجزیه شده و طی ۳۰ روز پس از کشت، قسمت اعظمی از ساکارز جذب و مورد استفاده قرار می‌گیرد. لذا برای مرحله رشد و بزرگ شدن ریزغده‌ها، منبع کربن ناچیزی باقی خواهد ماند، ولی با افزایش غلظت ساکارز، می‌توان انتظار داشت که منبع کربن کافی برای بزرگ شدن ریزغده وجود داشته باشد. وزن ریزغده از ۲۰/۵ میلی‌گرم تا ۲۴/۷۲ میلی‌گرم در غلظت‌های مختلف عناصر کم‌مصرف، متغیر بود، ولی از نظر آماری اختلاف معنی‌داری مشاهده نگردید، به‌طوری‌که در رابطه با عناصر کم‌مصرف، اختلاف معنی‌داری بین محیط‌کشت MS و تغییر یافته‌ها وجود نداشته و به‌نظر می‌رسد که غلظت ½ Mic می‌تواند نیازهای رشد سلول‌های ریزغده را فراهم سازد، پس می‌توان از محیط‌کشت MS یا تغییریافته آن استفاده نمود، ولی با توجه به هزینه‌ها، محیط‌کشت دارای ½ Mic توصیه می‌شود.




**شکل ۱۵- وزن ریزغده سیب‌زمینی رقم آگریا در غلظت‌های مختلف ساکارز و عناصر پرمصرف**

**Figure 15- The weight of the potato cv. Agria microtuber in different concentrations of sucrose and macro elements (DMRT, *p≤0.05*)**

ضریب همبستگی بین وزن ریزغده با صفات مورد اندازه‌گیری نشان داد که وزن ریزغده با تعداد شاخساره‌های تولیدی از جوانه جانبی رابطه منفی و معنی‌داری داشت. به‌عبارت دیگر، در محیط‌های کشتی که جوانه جانبی قادر به رشد و تولید شاخساره‌های جدید نبود، وزن ریزغده‌ها بالاتر بود. این امر نشان می‌دهد که هر ترکیب از عناصر پرمصرف و کم‌مصرف و نیز غلظت ساکارز و یا هر عامل دیگری که بتواند از رشد طولی شاخساره تولیدی از جوانه جانبی جلوگیری کند، می‌تواند باعث تشکیل ریزغده و در نهایت، منجر به تولید ریزغده‌های با وزن بالا گردد. از طرف دیگر، همبستگی مثبت و معنی‌داری بین وزن ریزغده با طول، قطر، درصد تشکیل ریزغده و تعداد جوانه روی ریزغده وجود داشته و در ریزنمونه‌ها و محیط‌های کشتی که طول، قطر و وزن ریزغده‌ها و تعداد جوانه روی ریزغده‌ها بالا بود، ریزغده‌های با وزن بالا تولید شد. این امر نشان می‌دهد که عوامل مشترکی روی این صفات تأثیرگذار می‌باشند. لذا در انتخاب محیط‌کشت مناسب، لازم است که بالا بودن این صفات مدنظر باشد (داده‌ها نشان داده نشده است).

## نتیجه‌گیری

در این مطالعه، محیط کشت 2Mac دارای ۱۶۰ گرم در لیتر ساکارز در اولویت اول و محیط کشت ½ Mac دارای ۸۰ گرم در لیتر ساکارز در اولویت دوم به‌علت تولید ریزغده‌های با وزن بالا و تعداد بیشتر جوانه روی ریزغده به‌عنوان تیمار برتر پیشنهاد می‌شود. ریزغده‌های تولیدی با وزن و اندازه بیشتر، از درصد رکود بیشتری برخوردار بودند و طی مراحل ریزغده‌زایی، جوانه‌های روی ریزغده‌ها قادر به جوانه‌زنی و تولید ریزغده نبودند. همچنین با توجه به تأثیر مواد آلی بر فرآیندهای ریخت‌زایی، پیشنهاد می‌شود که اثر نوع و غلظت ویتامین‌ها، اسیدهای آمینه و افزودنی‌های آلی روی فرآیند ریزغده‌زایی بررسی شود.

## References

1- Abelenda, J.A., Bergonzi, S., Oortwijn, M., Sonnewald, S., Du, M., Visser, R.G., & Bachem, C.W. (2019). Source-sink regulation is mediated by interaction of an FT homolog with a SWEET protein in potato. *Current Biology*, *29*, 1178-1186. https://doi.org/10.1016/j.cub.2019.02.018
2- Afrasiab, H., & Iqbal, J. (2012). Biochemical and molecular characterization of somaclonal variants and induced mutants of potato. *Pakistan Journal of Botany*, *44*, 1503-1508.
3- Ahloowalia, B.S. (1999). Minitubers for seed potato production. *Farm and Food*, *4*, 4-6.
4- Akita, M., & Takayama, S. (1994). Induction and development of potato tubers in a jar fermentor. *Plant Cell Tissue Organ Culture*, *36*, 177-182. https://doi.org/10.1007/BF00037717
5- Altindal, D., & Karadogan. (2011). The effect of carbon sources on *in vitro* microtubrization of potato (S*olanum tuberosum* L.). *Turkish Journal of Field Crops*, *15*, 7-11.
6- Ashrafzadeh, S., & Leung, D.W.M. (2015). Microtuber formation in potato callus. *ScienceAsia*, *41*, 1-4.
7- Bhojwani, S.S., & Razdan, M.K. (1996). Plant tissue culture: theory and practice, a revise edition Elsevier, 501 p.
8- Carlson, C., Groza, H.I., & Jiang, J. (2004). Induction of *in vitro* minimum potato plant growth and microtuberization. *American Journal of Potato Research*, *81*, 50-58.

9- Donnelly, D.J., Coleman, W.K., & Coleman, S.E. (2003). Potato microtuber production and performance: A review. *American Journal of Potato Research*, *80*, 103-115. https://doi.org/10.1007/BF02870209
10- Dwiati, M., & Anggorowati, S. (2011). Induction of *in vitro* culture of potato microtuber by using alar and dark photoperiod application. *Agrivita, Journal of Agricultural Science*, *33*, 47-52. https://doi.org/10.17503/agrivita.v33i1.38
11- Ebadi, M., & Iranbakhsh, A. (2011). The induction and growth of potato (*Solanum tuberosum* L) microtubers (sante cultivar) in response to the different concentrations of 6-benzylaminopurine and sucrose. *African Journal of Biotechnology*, *10*, 10626-10635. https://doi.org/10.5897/AJB11.047
12- Fujino, K., Koda, Y., & Kikuta, Y. (1995). Reorientation of cortical microtubules in the sub-apical region during tuberization in single-node stem segments of potato in culture. *Plant and Cell Physiology*, *36*, 891-895. https://doi.org/10.1093/oxfordjournals.pcp.a078835
13- Garner, N., & Blake, J. (1989). The induction and development of potato microtubers *in vitro* on media free of growth regulating substances. *Annals of Botany*, *63*, 663-674. https://doi.org/10.1093/oxfordjournals.aob.a087795
14- George, E.F. (1993*). Plant propagation by tissue culture. part1. The technology Exegetics England. Potato*. Ph.D. Thesis, Punjab Agricultural University Ludhiana India. http://dx.doi.org/10.1007/978-1-4020-5005-3_8
15- Hannapel, D.J. (2007*). Signaling the Induction of Tuber Formation*. In: Vreugdenhil D (Ed.), Potato Biology and Biotechnology. Elsevier B.V, 242-243. http://dx.doi.org/10.1016/B978-044451018-1/50054-3
16- Haque, A.V., Samad, M.A., & Shapla, T.L. (2009). *In vitro* callus initiation and regeneration of potato. *Bangladesh Journal of Agricultural Research*, *34*, 449-456. http://dx.doi.org/10.3329/bjar.v34i3.3971
17- Hemberg, T. (1985). *Potato rest*. *In:* Potato Physiology. P.H. Li (Ed). Academic Press Inc, Orlando, Fla. U.S.A. 354-388.
18- Hussain, I., Chaudhry, Z., Muhammad, A., Asghar, R., Naqvi, S.M.S., & Rashid, H. (2006). Effect of chlorocholine chloride, sucrose and BAP on *in vitro* tuberization in potato (*Solanum tuberosum* L. cv. Cardinal). *Pakestan Journal of Botany*, *38*, 275-282. http://dx.doi.org/10.13140/RG.2.2.26159.89763
19- Hussey, G., & Stacey, N.J. (1984). Factors affecting the formation of in vitro tubers of potato (*Solanum tuberosum* L.). *American Potato Journal*, *53*, 565-578. https://doi.org/10.1093/oxfordjournals.aob.a086720
20- Imani, A.A., Qhrmanzadeh, R., Azimi, J., & Janpoor, J. (2010). The effect of various of 6-benzylaminopurine (BAP) and sucrose on *in vitro* potato (*solanum tuberosum* L.) microtuber induction. *American-Eurasian Journal Agriculture and Environ. Science*, *8*, 457-459.
21- Iqbal, A.A., Rizwan, A., Mukhtar, Z., Mansoor, S., Mehmood, Z., & Asad, S. (2016). Establishment of an efficient and reproducible regeneration system for potato cultivars grown in Pakistan. *Pakistan Journal of Botany*, *48*, 285-290.
22- Jones, J.B. (1998). *Plant Nutrition Manual*. CRC Press, *Boca Raton, Florida, USA*. p. 149.
23- Joshi, A., & Mature, N. (2015). Micropropagation and conservation of endanger medicinal plant – *Leptadenia rticulata* (Retz.) wight and Arn. trought nodal explant. *International Journal of Current Advanced Research*, *4*, 382-385.
24- Karhu, S.T. (1997). Sugar use in relation to shoot induction by sorbitol and cytokinin in apple. *Journal American Society Horticulture Science*, *122*, 476–480. https://doi.org/10.21273/JASHS.122.4.476
25- Khalafalla, M.M., Abd Elaleem, K.G., Rasheid, S., & Modawi, R.S. (2010). Callus formation and organogenesis of potato (*Solanum tuberosum* L.) cultivar almera. *Journal of Phytology*, *2*, 40–46.
26- Khalil, M.M., Abd El Aal, A.M.H., & Samy, M.M. (2017). Studies on microtuberization of five potato genotypes. *Egyptian Journal of Horticulture*, *44*, 91-97. http://dx.doi.org/10.21608/ejoh.2017.1176.1011
27- Khuri, S., & Moorby, J. (1995). Investigations into the role of sucrose in potato cv. Estima microtuber production *in vitro*. *Annal of Botany*, *75*, 295-303. https://doi.org/10.1006/anbo.1995.1024
28- Kozak, D. (2003). Effect of medium components on *in vitro* tuberization of *Gloriosa rothschhildiana* óbrien. *Acta Horticultur*, *624*, 515-520. https://doi.org/10.17660/ActaHortic.2003.624.71
29- Leclerc, Y., & Donnelly, D.J. (1995). Microtuber dormancy in three potato cultivars. *American Potato Jornal*, *2*, 215-223. http://dx.doi.org/10.1007/BF02855037
30- Mamiya, K., & Sakamoto, Y. (1999). Effect of sugar concentration and strengthof basal medium on conversion of somstic embryos in *Asparagus Officinalis* L. *Scientia Horticulture*, *84*, 15-26. http://dx.doi.org/10.1016/S0304-4238(99)00098-9
31- Mengel, K., & Kirby, E.A. (1987). Principles of plantnutrition. International patash institute. *Worblaufen Bern, Switzerland*, 7(12), 687-695. http://dx.doi.org/10.1093/aob/mch063
32- Motallebi-Azar, A., Kazemiani, S., & Yarmohamadi, F. (2013). Effect of sugar/osmotica levels on *in vitro* microtuberization of potato (*Solanum tuberosum* L.). *Russian Agricultural Sciences*, *39*, 112-116. https://doi.org/10.3103/S1068367413020146
33- Motallebi-Azar, A., Kazemiani, S., Kiumarsie, F., & Mohaddes, N. (2011). Shoot proliferation from node explants of potato (*Solanum tuberosum* cv. Agria). II. effect of different concentrations of $NH_4NO_3$, hydrolyzed casein and BAP. *Romanian Biotechnological Letters*, *16*, 6181-6186.

34- Ortiz-Montiel, G., & Lozoya-Saldafia, H. (1987). Potato minitubers: Technology validation in Mexico. *American Potato*, *64*, 535-544. http://dx.doi.org/10.1007/BF02853752
35- Salem, J., & Hassanein, A.M. (2017). In vitro propagation, microtuberization, and molecular characterization of three potato cultivars. *Biologia Plantarum*, *61*, 427-437. https://doi.org/10.1007/s10535-017-0715-x
36- Seabrook, J.E.A., Douglass, L.K., & Arnold, D.A. (2004). Effect of leaves on microtubers produced from potato single-node cutting *in vitro*. *American Journal of Potato Research*, *81*, 1-5. https://doi.org/10.1007/BF02853830
37- Shacklock, P.S., Read, N.D., & Trewavas, A.J. (1992). Cytosolic free calcium mediates redlight induced photomorphogenesis. *Nature*, *358*, 753-755. https://doi.org/10.1038/358753a0
38- Shahriyar, S., Akram, S., Khan, K., Miya, F., & Sarkar, A.R. (2015). *In vitro* plant regeneration of potato (*Solanum tuberosum* L.) at the rate of different hormonal concentration. *Asian Journal of Medical and Biological Research*, *1*, 297-303. http://dx.doi.org/10.3329/ajmbr.v1i2.25625
39- Shibli, R.A., Abu-Ein, A.M., & Ajlouni, M.M. (2001). *In vitro* and *in vivo* multiplication of virus free "Spunta" potato. *Pakistan Journal. Botanica*, *33*, 35-41. https://doi.org/10.22059/ijhs.2015.54133
40- Simko, I. (1994). Sucrose application causes hormonal changes associated with potato tuber induction. *Journal Growth Regulator*, *13*, 73-77. https://doi.org/10.1007/s10725-004-5827-6
41- Sonnewald, S., & Sonnewald, U. (2014). Regulation of potato tuber sprouting. *Planta*, 239, 27-38. https://doi.org/10.1007/s00425-013-1968-z
42- Tetsumura, T., Matsumoto, Y., & Sato, M. (2008). Evaluation of basal media for micropropagation of four highbush blueberry cultivars. *Science Horticulture*, *119*, 72-84. http://dx.doi.org/10.1016/j.scienta.2008.06.028
43- Yu, W.C., Joyce, P.J., Cameron, D.C., & McCown, B.H. (2000). Sucrose utilization during potato microtuber growth in bioreactors. *Plant Cell Reports*, *19*, 407-413. http://dx.doi.org/10.1007/s002990050748